

Aus dem Robert Koch-Institut, Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
Direktor: Professor Dr. med. Hansjürgen Raettig

**Erfolg der oralen Impfung
mit Zellwand- und Protoplasmafraktionen
aus *S. typhi* murium-Bakterien
im Mäuseschutzversuch**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hans Joachim Kolb
aus Tübingen

1971



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548807_0087

Aus dem Robert Koch-Institut, Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
Direktor: Professor Dr. med. Hansjürgen Raettig

**Erfolg der oralen Impfung
mit Zellwand- und Protoplasmafraktionen
aus *S. typhi* murium-Bakterien
im Mäuseschutzversuch**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hans Joachim Kolb
aus Tübingen

Referent: Prof. Dr. med. Hansjürgen Raettig

Korreferent: Prof. Dr. med. Karl-Otto Habermehl



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 8.7.1971

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
<u>Einleitung</u>	1
<u>Material und Methoden</u>	4
1. <u>Herstellung der Impfstoffe</u>	4
a) Aufspaltung der Bakterien	4
b) Bakterien	5
c) Arbeitsgang der Fraktionentrennung	5
d) Ganzzell-Impfstoff	7
e) Inaktivierung	7
2. <u>Relation zwischen Ganzzell-Titer und Fraktionendosis</u>	7
3. <u>Versuchstiere</u>	9
4. <u>Immunisierung</u>	9
5. <u>Infektion</u>	10
<u>Ergebnisse</u>	11
1. <u>Infektionsstärke</u>	11
2. <u>Wirksamkeit der gereinigten Zellwand-, Protoplasma- und Ganzzell-Impfstoffe</u>	12
3. <u>Einfluß der Inaktivierungszeit und -temperatur auf die Impfstoffe</u>	15
4. <u>Dosisabhängigkeit der Schutzwirkung</u>	18
5. <u>Varianz der Wirksamkeiten</u>	22
<u>Diskussion</u>	28
<u>Zusammenfassung</u>	33
<u>Literatur</u>	34

Einleitung

Über die orale Impfung gegen Darminfektionen mit Salmonellen sowohl im Tier- als auch im Feldversuch ist seit der Jahrhundertwende berichtet worden. Eine umfassende Zusammenstellung auf diesem Gebiet (29) zeigt, daß die orale Route der Impfstoff-Applikation in der Lage ist, eine belastungsfähige Immunität aufzubauen. Bemerkenswert ist jedoch - und das hat die orale mit der parenteralen Impfung gemeinsam -, daß in einigen Fällen der erwünschte Schutz ausbleibt.

Gerade in letzter Zeit ist die Unzufriedenheit mit der derzeit praktizierten parenteralen Typhus-Impfung wieder besonders laut geworden.

Die Schwierigkeit, der sich die Untersucher dieses Problems gegenübersehen, ist besonders in zwei Tatsachen zu suchen:

Erstens ist es bis heute noch nicht gelungen, eine allgemein anerkannte, befriedigende Erklärung über die Art des Immunmechanismus zu finden, der bei der Anti-Typhus-Immunisierung in Gang kommt. So herrscht keine einheitliche Meinung darüber, ob etwa eine lokale Darmimmunität (2) oder eine allgemeine am humoralen oder cytophilan Antikörper zu messende Immunität (15), ob eine zelluläre Immunität (gesteigerte Phagocytentätigkeit) (3) oder intestinale Antikörper bzw. deren Stammzellen (39, 11, 33) die entscheidende Rolle spielen. Gleichfalls ungeklärt sind spezifische und unspezifische Anteile der Gesamtimmunität.

Zweitens gibt es kein geeignetes Laboratoriumstier, bei dem man eine natürliche Typhuserkrankung kennt (23). Bei einer oralen Infektion der üblichen Nager-Versuchstiere mit *S. typhi* und *S. paratyphi* stirbt normalerweise keines dieser Tiere.

Als Infektionsmodell wird deshalb häufig die Empfänglichkeit der weißen Maus gegenüber *S. typhi murium* herangezogen, deren Krankheitsverlauf weitgehend dem der humanen Pathomorphose entspricht (Mäusetyphus).

Besonders aufschlußreich wird dieses Infektionsmodell dadurch, daß eine Infektion auch auf oralem Wege möglich ist, und es somit eine weitere wichtige Parallele zur menschlichen Erkrankung aufweist. Dadurch ist es möglich, in diesem Modell die Schutzwirkung einer oralen Impfstoffanwendung an ihren wichtigsten Kriterien zu beurteilen: der Verlängerung der individuellen Überlebenszeit und der Senkung der Gesamtmortalität nach Ablauf der Epidemie.

Durch die teilweise bescheidene Wirkung einiger Impfkampagnen (25, 8) wurden die Versuche intensiviert, wirksamere Impfstoffe und -praktiken zu entwickeln. Die Erfolge der Biochemie bei der Zuordnung von chemischen Stoffklassen zu den Trägern der Immunität (40, 41, 22) verstärkten die Suche nach den wirksamen Teilkomponenten der Bakterien.

Neben vielfältigen chemischen Extraktionsmethoden sind besonders mechanische Verfahren entwickelt worden, die auf die Isolierung der Bakterienzellfraktionen abzielen. Die Trennung des Protoplasmas von den Zellwänden nimmt dabei eine Sonderstellung ein. Um eine möglichst reine Darstellung dieser beiden Zellkomponenten zu erhalten, bedarf es einer schonenden Methode, die Integrität des Bakteriums so zu zerstören, daß das Protoplasma aus der Zelle ausfließen kann, ohne die Zellwand selbst in ihrem strukturellen Aufbau entscheidend zu schädigen. Neben den schon länger angewandten Methoden der osmotischen Aufsprengung und des Frier-Tau-Verfahrens, arbeitet man heute besonders mit Ultraschall, Vibrationsgeräten und Hochdruckapparaten. E. RIBI (35) stellte 1959 einen Apparat vor, in dem die Bakterien in einer hydraulischen Druckkammer unter hohen Druck gesetzt und durch ein feines Ventil ausgepresst werden. Durch die Kombination von Druck und plötzlicher Druckentlastung platzen die Bakterien und entlassen das lösliche Protoplasma aus der Umhüllung. Durch anschließende Zentrifugation können die beiden Fraktionen voneinander getrennt werden.

Bei der Prüfung dieser beiden Fraktionen auf ihre immunogenen Eigenschaften fanden RIBI et al. (34), daß bei der intravenösen Anwendung eine schützende Wirkung besonders von den Zellwänden ausgeht. Sie war

größer als die mit den intakten Zellen erreichte. Vom Protoplasma dagegen ging nur ein sehr geringer Schutz aus.

Die vorliegende Arbeit prüft die Frage, ob die mechanisch isolierten Zellwand- und Protoplasmafraktionen auch auf oralem Immunisierungsweg mit anschließender oraler Belastungsinfektion im Mäuseschutzversuch wirksam sind. Unter den optimalen Immunisierungs- und Infektionsbedingungen, die von RAETTIG für den Ganzzellen-Totimpfstoff aus *S. typhi* murium erarbeitet worden sind (30), sollte geprüft werden, ob eine der beiden Fraktionen eine Verbesserung des Impfschutzes gegenüber dem herkömmlichen hitzeabgetöteten Ganzzell-Impfstoff zu erreichen vermag.

Material und Methoden

1. Herstellung des Impfstoffes

a) Aufspaltung der Bakterien

Die Herstellung der Zellwand- und Protoplasma-Impfstoffe erfolgte in der sogenannten RIBI-Presse (RIBI Refrigerated Cell Fractionator, Hersteller: Ivan Sorvall Inc., Horwalk, Connecticut; Modell RF-1) nachdem Versuche mit der Frier-Tau-Methode keine befriedigenden Ergebnisse erbracht hatten.

Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine Weiterentwicklung der FRENCH-Druckkammer (10), in der bakterielle Suspensionen durch eine feine, im Durchmesser variierbare Öffnung eines Nadelventils unter hohem Druck ausgepreßt wurden. Durch Scherkräfte und plötzliche Druckentlastung kam es dabei zum Aufspalten der bakteriellen Keime.

RIBI hat die unerwünschte Erhitzung des ausfließenden Materials in dieser Druckkammer durch ein System der direkten Kühlung ausgeschaltet: auf minus 50 ° C vorgekühltes Stickstoffgas wird dabei direkt auf das Orificium geleitet, so daß die Erwärmung des gepreßten Materials auch bei hohen Druckwerten (bis zu 4000 Atm) 15 ° C nicht überschreitet. Die Aufspaltung kann somit bei einer Temperatur erfolgen, bei der weder starke enzymatische Aktivität noch Zerstörung der Proteine auftreten.

Die für die einzelnen Bakterienarten zur vollständigen Aufspaltung erforderliche Druckhöhe wurde mittels elektronenmikroskopischer Kontrolle des aufgespaltenen Materials bestimmt. Für Salmonellen und speziell für Salmonella typhi murium wurde eine optimale Druckhöhe von 20.000 psi (1360 Atm) ermittelt. Diese gewährleistet die schonendste Aufspaltung, bei der nämlich das Protoplasma aus der Zelle ausfließen kann, ohne daß dabei die Struktur der Zellwand wesentlich verändert wird. Während bei

höheren Drücken die Zellwände in kleinere Bruchstücke frakturiert werden, bleibt bei niedrigeren Drücken ein größerer Prozentsatz der Bakterien unaufgesprengt. Im günstigsten Fall werden etwa 95 % der Keime gesprengt, wobei die Zellwand unter dem Elektromikroskop als aufgeplatzter, leerer Sack imponiert.

Die anschließende Trennung von Zellwänden und Protoplasma mittels Dichtegradienten-Zentrifugation ist technisch einfach durchzuführen.

Die weitgehende Automatisierung des Aufsprengverfahrens sowie die große Kapazität der Presse waren die wesentlichen Voraussetzungen für die Durchführbarkeit eines so umfangreichen Schutzversuches.

b) Bakterien

Alle Impfstoffe wurden aus *Salmonella typhi* murium Stamm 6656 hergestellt. Dieser Stamm ist gegenüber dem Phagen 8 der neuen internationalen Lysotypie-Klassifizierung empfänglich.

Der Stamm wurde seit 5 Jahren auf Agarplatten mit intermittierenden Mäusepassagen gehalten. Zur Anzüchtung wurde er in Vollbouillon überimpft und 4 Stunden bei 37 °C bebrütet. Je 5 ml dieser Bouillon wurden auf große Agarschalen gebracht und 24 Stunden bei 37 °C bebrütet. Von dort wurden sie mit Glasspatel oder Glassperlen geerntet.

Ein SR-Formenwechsel wurde nicht beobachtet.

c) Arbeitsgang der Fraktionentrennung

Die konzentrierte Bakteriensuspension von der Plattenernte wurde zur Auswaschung von verunreinigendem Nährbodenmaterial zweimal in Aqua dest. aufgeschwemmt, bei 12.100 G über 20 Minuten sedimentiert und danach zwei Stunden im OMNI-Mixer (Firma Sorvall) bei Stufe 6 homogenisiert.

Das Sediment des letzten Waschvorganges wurde im Mengenverhältnis Keime : Aqua dest. = 1 : 8 resuspendiert und die noch lebenden Bakterien in der RIBI-Pressen unter konstantem Druck von 20.000 psi (1360 Atm) und einer Ausflußtemperatur von 8-10 °C aufgebrochen.

Die erste Trennung der desintegrierten Bakterienbestandteile erfolgte in der Kühlzentrifuge RC-2B (Firma Sorvall) über 1 Stunde bei 2700 G.

Der Überstand dieser Fraktionentrennung, die "Protoplasma-Fraktion", wurde zur weiteren Reinigung von restlichen Zellwandfragmenten, Zytoplasmamembranen, Ribosomen etc. in der SPINCO-Ultrazentrifuge einer Sedimentierung über 3 Stunden bei 105.600 G unterworfen. Das gewonnene Material wurde lyophilisiert und bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt.

Das Sediment der ersten Fraktionentrennung, die "rohe Zellwand-Fraktion" wurde in drei weiteren Arbeitsgängen gereinigt:

- Ein kleiner Anteil nicht aufgesprengter Ganzzellen setzte sich in einer dünnen Schicht am Boden des Zentrifugenglases ab. Er wurde bei der Entnahme der Zellwände zurückgelassen und verworfen.
- Zur Beseitigung von löslichen protoplasmatischen Verunreinigungen wuschen wir das Material 1 Stunde lang in 1 Mol NaCl. Die Nachwäsche erfolgte zweimal in Aqua dest. je 1 Stunde lang. Die Sedimentation wurde in allen drei Fällen bei 20.000 G über eine Stunde vorgenommen.
- Zur Entfernung der strukturegebundenen Proteinbestandteile, insbesondere der Reste der Protoplasmamembran, setzten wir die Zellwandsuspension einer dreistündigen Trypsinverdauung aus. Die zweimalige Nachwäsche wurde ebenfalls je 1 Stunde in Aqua dest. durchgeführt und bei 20.000 G sedimentiert.

Diese nunmehr "gereinigte Zellwand-Fraktion" wurde lyophilisiert

und bis zur Verimpfung bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt.

Das Gewichtsverhältnis der Protoplasma- zur gereinigten Zellwand-Fraktion im gefriergetrockneten Zustand betrug etwa 2 : 1. Der Stickstoffgehalt der gereinigten Zellwände wurde mit der Mikro-Kjeldahl-Methode auf 11 % bestimmt.

d) Ganzzell-Impfstoff

Der Ganzzell-Impfstoff wurde ebenfalls aus *S. typhi murium* Stamm 6656 hergestellt. Die Keimsuspension aus der Ernte von den großen Agarplatten wurde visuell nach der Trübung oder durch Plattieren einer Verdünnungsreihe auf 10^9 Keime/ml eingestellt und bei 100°C drei Minuten im Wasserbad inaktiviert. Die Sterilitätskontrolle ergab keine vermehrungsfähigen Keime.

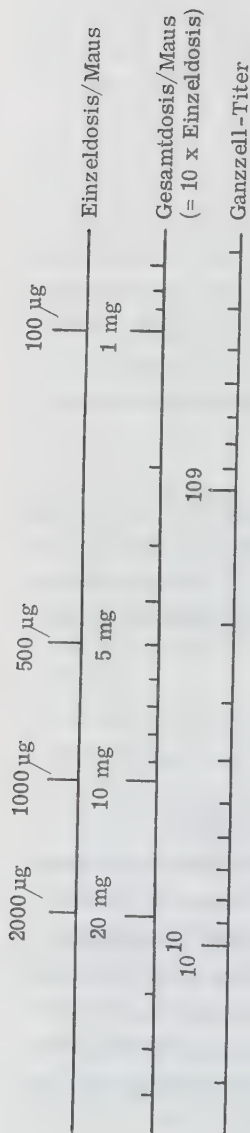
e) Inaktivierung

Die gereinigten Zellwände und das Protoplasma wurden zur Abtötung eventuell vorhandener, vermehrungsfähiger Ganzzellen einer Hitzeinaktivierung unterzogen. Wir erhitzen die resuspendierten Lyophilisate im Wasserbad. Die angewandten Inaktivierungszeiten und -temperaturen betrugen:

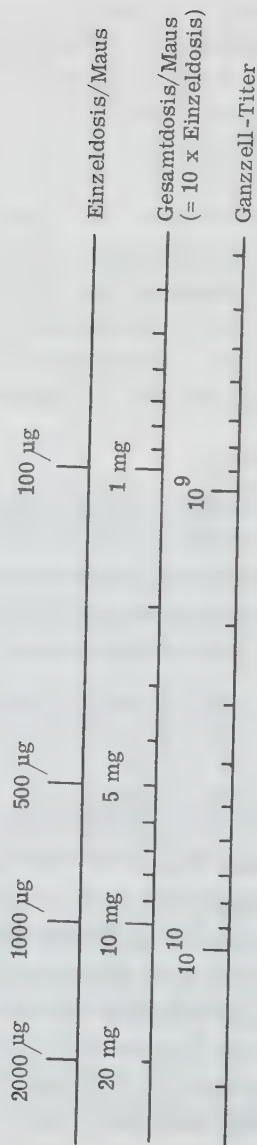
60°C bei 30 Minuten ($60^\circ/30'$)
 100°C bei 3 Minuten ($100^\circ/3'$)

2. Relation zwischen Ganzzell-Titer und Fraktionen-Dosis

Der Keimtiter der konzentrierten, frisch von den Platten geernteten Bakteriensuspension wurde im Kolonie-Zählverfahren nach Plattieren einer Verdünnungsreihe bestimmt. Bei unserer 3. Impfstoffherstellung betrug er im Mittel 5×10^9 Keime/ml. Von einer Gesamternte von 420 ml wurden 20 ml zur Herstellung des Ganzzell-Impfstoffes verwandt, der Rest von 400 ml zur Gewinnung der Zellwände und des Protoplasmas der RIBI-Presse zugeführt. Die Gesamtkeimzahl, die in das Aufsprengverfahren eingebracht wurde, betrug demnach 2×10^{12}



Relation zwischen Ganzzell-Titer und Protoplasma-Dosis



Relation zwischen Ganzzell-Titer und Zellwand-Dosis

Keime. Eine grobe Schätzung ergibt für den Verlust in Presse, Reinigungsgängen und Gefriertrocknung etwa 10 %, so daß in dem lyophilisierten Impfstoff-Material das Protoplasma und die Zellwände von $1,8 \times 10^{12}$ Keimen enthalten waren.

Das Gewicht der lyophilisierten Zellwände betrug 2025 mg, das des lyophilisierten Protoplasmas 4190 mg.

Damit enthält

1 mg Zellwand-Impfstoff Zellwände von etwa 9×10^8 Keimen

1 mg Protoplasma-Impfstoff Protoplasma von etwa $4,4 \times 10^8$ Keimen.

3. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten weiße NMRI-Mäuse (National Medical Research Institute) aus der Zucht der Zentralen Versuchstieranstalt des Bundesgesundheitsamtes, die bei Immunisierungsbeginn ca. 2-3 Wochen alt waren und 14-16 g wogen. In Versuch 7 und 8 arbeiteten wir zur Hälfte mit Falb-Mäusen eigener Zucht. Tiere beiderlei Geschlechtes wurden in Plastikkäfigen zu je 25 Stück gehalten und mit Trockenfutter "Altromin" und Leitungswasser ad libitum ernährt. Die Kontrolltiere wurden unbehandelt unter denselben Bedingungen gehalten.

4. Immunisierung

Die Immunisierung der Mäuse erfolgte in allen Versuchen auf oralem Wege. Wir benutzten eine stumpfe, rechtwinklig gebogene Metallsonde, die in den Schlund eingeführt wurde. Diese Technik erlaubte eine exakte Dosierung und verursachte bei richtiger Durchführung keine sichtbaren Verletzungen. Als Impfrhythmus wählten wir die von RAETTIG als optimal ermittelte zehnmahlige Impfung innerhalb von 14 Tagen.

Die Einzeldosen betrugen 100 μ g, 500 μ g, 1000 μ g bzw. 2000 μ g. Nach abgeschlossener Immunisierung erhielt also jede Maus 1 mg,

5 mg, 10 mg bzw. 20 mg des Zellwand- bzw. Protoplasma-Impfstoffes. Jede Einzeldosis war in 0,25 ml physiologischer NaCl-Lösung enthalten.

Der Ganzzell-Impfstoff war auf einen Titer von 10^9 Keimen/ml Vollbouillon eingestellt. Jede Maus erhielt eine Einzeldosis von 0,25 ml, also eine Gesamtdosis von $2,5 \times 10^9$ hitzeabgetöteter Keime.

Die Impfstoffe wurden von den Tieren ohne sichtbare Beeinträchtigung ihrer Gesundheit vertragen.

5. Infektion

Die Belastungsinfektion erfolgte 10 Tage nach der letzten Impfstoffapplikation. Dazu verabfolgten wir jeder Maus mit der Schlundsonde 0,25 ml einer unverdünnten 6-Stunden-Bouillon-Kultur, deren Keimgehalt in den verschiedenen Versuchen zwischen 3×10^8 und 5×10^9 Keimen/ml variierte.

Als Infektionsstamm diente in den Versuchen 6 bis 10 der Stamm 6656, der auch zur Impfstoff-Herstellung verwandt wurde, in den Versuchen 3, 4, 5, 11 und 12 eine Mischung aus den drei *S.typhi* *muri*um Stämmen 6656, 6659, 6616.

Am 25. Tag post infectionem schlossen wir die Versuche ab, da zu diesem Zeitpunkt die Endmortalitäten erreicht waren.

Ergebnisse

1. Infektionsstärke

In Abb. 1 sind für die einzelnen Schutzversuche die Prozentzahlen der Endmortalität der nicht immunisierten Kontrolltiere graphisch dargestellt.

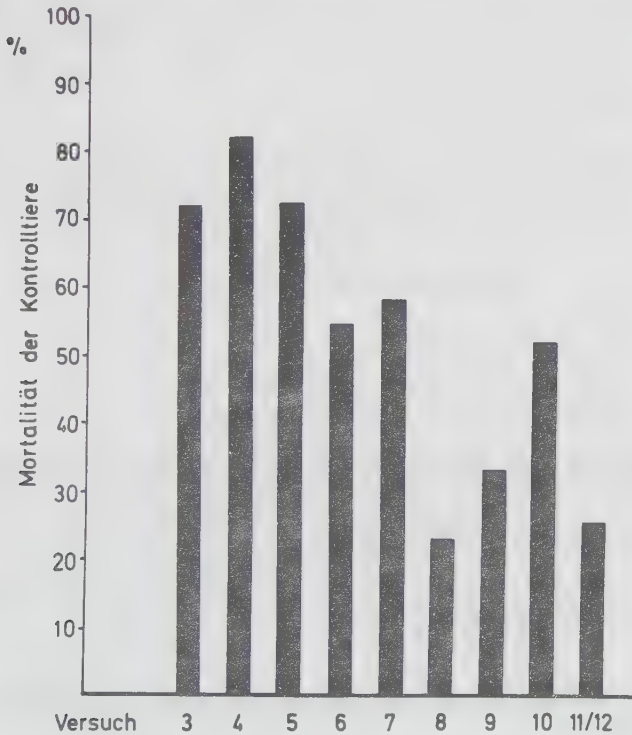


Abb. 1 Endmortalitäten der unbehandelten Kontrolltiere. Infektion oral mit etwa $2,5 \times 10^8$ S. typhi murium-Bakterien.

Die Endmortalitäten der Kontrolltiere können als Maß für die Stärke der Belastungsinfektion gelten. So waren z. B. in Versuch 4 bis zum 25. Tag post infectionem 82 % der am Versuch beteiligten Kontrolltiere gestorben. Für eine orale Infektion mit *S. typhi murium* bedeutet das einen "stürmischen" Epidemieverlauf. In Versuch 11 dagegen betrug die Endmortalität 30 %, was einem "flachen" epidemischen Verlauf entspricht. Diese beobachtete hohe Varianz der Endmortalitäten war nicht von der Menge der inokulierten virulenten Salmonellen abhängig. Auch konnte die Stärke der Epidemie durch Verwendung einer Mischung aus drei verschiedenen *S. typhi murium*-Stämmen nicht beeinflußt werden.

Um ein von der Infektionsstärke unabhängiges, vergleichbares Maß der Impfstoff-Schutzwirkungen zu erhalten, wurde die Wirksamkeit der einzelnen Impfstoffe nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Wirksamkeit} = \frac{(b-a) 100}{b}$$

Dabei bedeutet

b = Endmortalität in % der Kontrolltiere

a = Endmortalität in % der immunisierten Tiere.

Dieser Wert gibt also die Relativprozente der überlebenden geimpften Tiere an, bezogen auf eine 100%ige Endmortalität der zugehörigen nichtgeimpften Kontrolltiere.

In Abb. 7 sind die Wirksamkeiten aller von uns immunisierten Gruppen summarisch zusammengestellt.

2. Wirksamkeit der gereinigten Zellwand-, Protoplasma- und Ganzzell-Impfstoffe

In vier Einzelversuchen mit insgesamt 1153 Tieren prüften wir die Frage, ob die beiden zu testenden Impfstoffe aus Protoplasma und Zellwänden von *S. typhi murium* im Belastungsversuch eine signifi-

kante Schutzwirkung vermitteln können. Wie in allen von uns durchgeführten Versuchen immunisierten wir gleichzeitig ein ebenso großes Kollektiv Mäuse mit hitzeinaktivierten Ganzzellen, deren Wirksamkeit aus früheren, umfangreichen Versuchen bekannt war (30). Die Immunisierungseinzeldosen betrugen $1000 \mu\text{g}/\text{die}$ und wurden zehn Mal oral appliziert. Die Zellwände wurden bei $100^{\circ}/3'$ inaktiviert, das Protoplasma bei $60^{\circ}/30'$.

In Abb. 2 sind die Mortalitätssummenkurven für die drei Impfstoffe und die Kontrollen dargestellt. Ihre Verläufe sind typisch für eine Explosionsepidemie (28). Der flache Verlauf der Kurven bis zum 5. Tag entspricht der Inkubationszeit, während der steilere Anstieg von 5. - 18. Tag die manifeste Phase der zyklischen Infektionskrankheit darstellt. Am 24. Tag waren die Endmortalitäten aller Gruppen erreicht. In der Kontrollgruppe waren am 25. Tag 37 % der Tiere

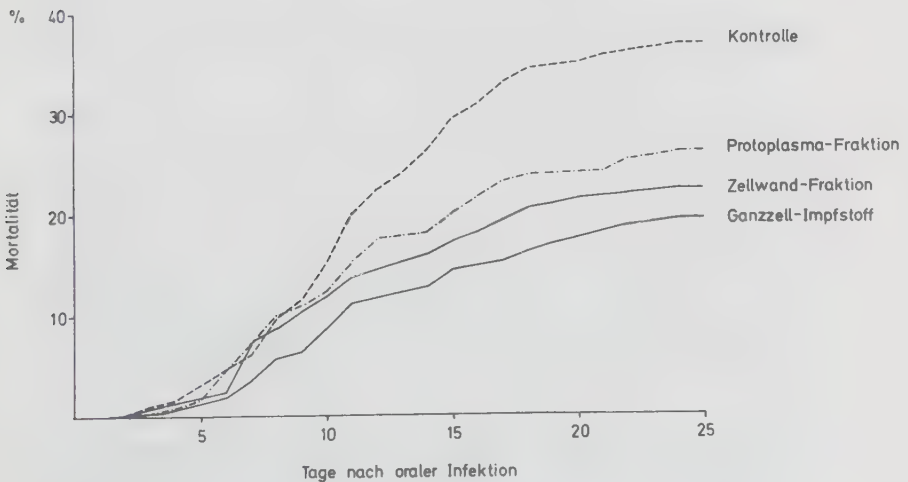


Abb. 2 Absterbekurven von weißen Mäusen, die mit Protoplasma (10 mg), Zellwänden (10 mg) und hitzeabgetöteten Ganzzellen (10^9) aus *S. typhi murium* geimpft wurden.

gestorben. Die Mortalität des mit Ganzzellen immunisierten Kollektives konnte gegenüber der Kontrollgruppe um fast die Hälfte auf 20 % gesenkt werden. Dies entspricht einer Wirksamkeit von 47,0 und damit einer Größenordnung, wie wir sie aus den früheren Versuchen erwarten konnten (30).

Die Absterbekurven der mit Protoplasma- und Zellwand-Impfstoffen immunisierten Tiere verlaufen bis etwa zum 10. Tag zusammen mit der Kurve für die Kontrolltiere, verlaufen dann aber flacher und erreichen eine Endmortalität von 26,3 % bzw. 22,4 %.

In Tab. 1 sind diese Ergebnisse numerisch und statistisch aufgeführt:

- n ist die Gesamtzahl der mit einem Impfstoff behandelten Mäuse,
- + ist die Anzahl der bei Versuchsende gestorbenen Tiere,
- a% ist die sich aus diesen beiden Zahlen ergebende Prozentzahl = die Mortalität des Kollektives nach abgelaufener Infektion. Daneben stehen dieselben Größen für das Kontrollkollektiv (b%),
- D_b ist die Differenz aus den Mortalitäten der Kontrollen (b%) und der immunisierten Tiere (a%).
- D_z sind die nach KOLLER (19) größtzulässigen Zufallsdifferenzen bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 %, d. h. daß ein statistisch signifikanter Unterschied besteht, falls D_b größer als D_z ist. Der Quotient dieser beiden Werte ist als Echtheit E aufgeführt. Aus der Definition ergibt sich, daß bei allen Echtheitswerten über 1 eine überzufällige Varianz vorliegt und somit eine statistisch gesicherte Aussage gemacht werden kann.
- W ist die Wirksamkeit gemäß oben aufgeführter Formel.

Der Ganzzell-Impfstoff, der den besten Schutz zu vermitteln vermag, erreicht eine Wirksamkeit von 47,0 bei einer Echtheit von 1,7. Die beiden Fraktionen aus der RIBI-Pressen erreichen Wirksamkeiten von 39,5 bzw. 29,0 und liegen damit deutlich unter dem durch hitze-inaktivierte Ganzzellen induzierten Schutz. Auch hierfür liegen die Echtheitswerte über 1.

Impfstoff	Immunisierte Tiere			Kontroll-Tiere			D_b	D_z	E	W
	n	+	a%	n	+	b%				
Zellwände	286	64	22,4	295	109	37,0	14,6	10,1	1,43	39,5
Protoplasma	279	73	26,3	295	109	37,0	10,7	10,1	1,05	29,0
Ganzzellen	293	58	19,7	295	109	37,0	17,3	10,0	1,73	47,0

Tabelle 1

3. Einfluß der Inaktivierungszeit und -temperatur auf die Impfstoffe

Wie wir nach der Resuspension der lyophilisierten Impfstoffe feststellten, waren trotz der verschiedenen Reinigungsprozeduren noch vermehrungsfähige Keime in unserem Impfstoff nachzuweisen. Damit ergab sich die Frage, unter welchen Bedingungen diese Restaktivität beseitigt werden kann, ohne die antigenen Strukturen der gereinigten Zellwände oder des Protoplasmas entscheidend zu beeinflussen.

Wir wählten die Erhitzung im Wasserbad als Inaktivierungsmodus, da wir über die Zusammenhänge zwischen Hitzeeinwirkung und potentieller Schutzwirkung bei Ganzzellen auf die Arbeiten von KORDES zurückgreifen konnten (20). Er fand, daß die schützende Wirkung von kurzzeitig und hoch erhitzten *S. typhi murium*-Bakterien bei $100^{\circ}/3'$ besser ist als diejenige von lang aber niedriger erhitzten bei $60^{\circ}/70'$. Der folgende Versuchsansatz sollte klären, ob diese Abhängigkeit von Inaktivierungszeit und -temperatur auch für die beiden separaten Zellbestandteile gültig ist.

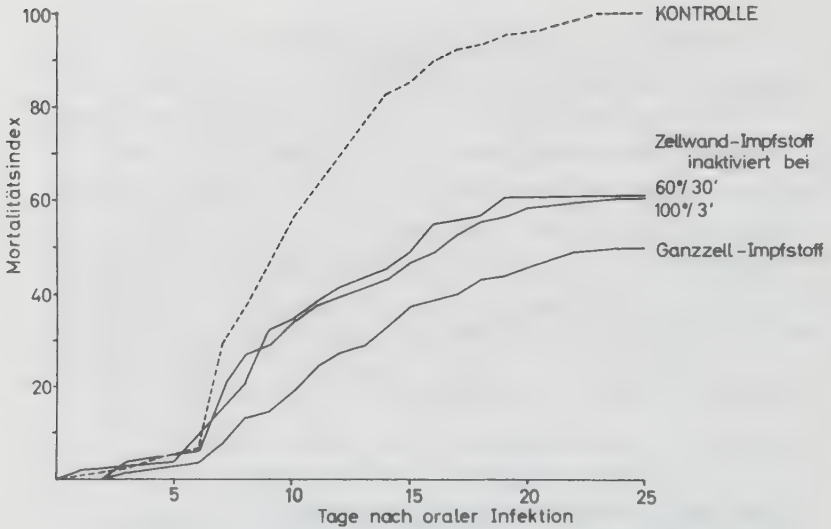


Abb. 3 Verschiedene Inaktivierungszeit und -temperatur auf den Zellwand-Impfstoff (Kollektiv von 386 Mäusen)

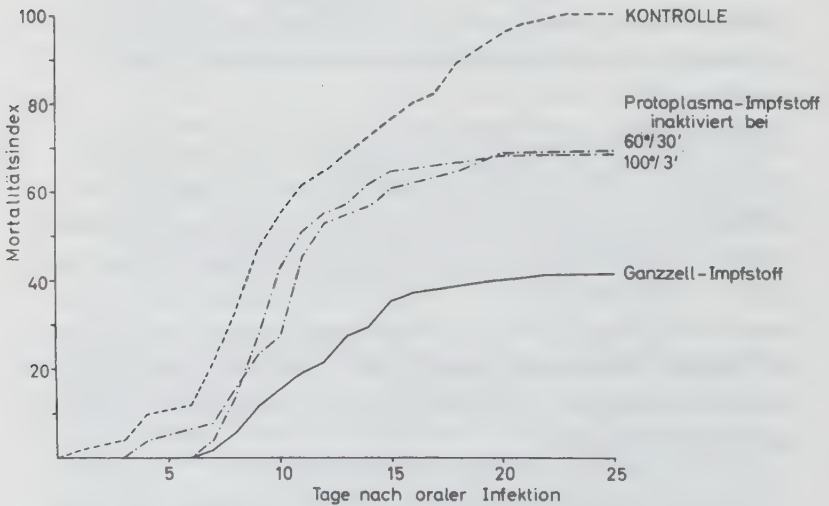


Abb. 4 Verschiedene Inaktivierungszeit und -temperatur auf den Protoplasma-Impfstoff (Kollektiv von 200 Mäusen)

Die Prüfung erfolgte bei $60^{\circ}/30'$ und $100^{\circ}/3'$. In Abb. 3 ist das Ergebnis für den Zellwand-Impfstoff durch Darstellung der Mortalitäts-summenkurven wiedergegeben. Um vergleichbare Werte bei den verschiedenen Infektionsstärken zu erhalten, sind die Endmortalitäten der Kontrollgruppen aller beteiligten Versuche gleich 100 % gesetzt und die Mortalitäten der immunisierten Gruppen als Relativprozent angegeben (Mortalitätsindex). Der Ganzzell-Impfstoff konnte die Mortalität auf 50 % senken und zeigte damit wieder die beste Schutzwirkung. Die Absterbekurve der Mäusekollektive, die mit verschiedenen inaktiviertem Zellwand-Impfstoff geimpft wurden, haben einen sehr ähnlichen Verlauf. Die Endmortalitäten liegen bei 61 %, was einer Wirksamkeit von 39 entspricht.

Damit konnten wir zeigen, daß hier der bei $60^{\circ}/30'$ inaktivierte Zellwand-Impfstoff bei oraler Impfung denselben Schutz im Belastungsversuch bietet wie der bei $100^{\circ}/3'$ inaktivierte.

Auch für die Protoplasma-Fraktion konnten wir keinen Unterschied der verschiedenen inaktivierten Impfstoffe feststellen (s. Abb. 4). Dagegen liegt die Wirksamkeit mit 31, wie schon erwähnt, unter der des Zellwand-Impfstoffes mit 39.

Die Unabhängigkeit der Impfstoff-Wirksamkeit von der Art der Hitzeinaktivierung ist auch anhand der Einzelversuche nachweisbar (Versuch 12 siehe Abb. 8).

Diese Ergebnisse erlauben uns, in den folgenden Tabellen und Abbildungen die Inaktivierungszeiten und -temperaturen unberücksichtigt zu lassen.

4. Dosisabhängigkeit der Schutzwirkung

Bei unseren Versuchen zur Klärung der Dosisabhängigkeit des durch die Impfung induzierten Schutzes, stellte sich zunächst die Frage, ob bei hohen Dosen neben der schützenden Antigenität auch eine schädigende Wirkung der Impfstoffe auftritt. Da als belastender Faktor das hauptsächlich in der Zellwand lokalisierte Endotoxin in Frage kommt, prüften wir unsere Zellwand-Fraktion in einem Vorversuch auf ihre Toxizität. Zwar ist von hitzeabgetöteten *S. typhi murium*-Ganzzellen auch in hoher Dosierung eine schädigende Impfstoffwirkung bei oraler Applikation nicht bekannt (18), doch ist sie für die im mechanischen Verfahren hergestellten Zellwände nicht auszuschließen. Für die gereinigten Zellwände von *S. enteritidis* z. B. ist bei i.v.-Gabe eine siebenfach höhere Endotoxinaktivität nachgewiesen als für gleiche Mengen von Ganzzellen (34).

Dosierung	n	+
10 x 4000 µg	7	0
10 x 400 µg	7	2
10 x 40 µg	7	2
Kontrolle	7	3

Tab. 2: Vorversuch zur Toxizitätsprüfung der Zellwände

Wie die Ergebnisse unseres Vorversuches zeigen (s. Tab. 2), wirkt der Endotoxingehalt der Zellwände bis zu einer Dosierung von insgesamt 40 mg/Maus nicht so stark schädigend, daß die Beurteilung einer schützenden Wirkung nicht mehr möglich wäre. Diese 40 mg Zellwand-Trockenmaterial entsprechen einem Ganzzell-Titer von umgerechnet $3,6 \times 10^{10}$.

Die geringste Dosis, die wir im Hauptversuch zur Immunisierung der Mäuse verwandten, war 100 µg. Für unser Impfschema mit zehnmaliger oraler Verfütterung ergibt sich eine Gesamtimmunsierungsdosis von 1 mg/Maus und hält sich damit in der Größenordnung des Ganzzell-Titers von 10^9 , mit dem unsere "Positiv-Kontroll-Mäuse" immunisiert wurden. Die anderen Dosierungen betrugen das 5-fache, 10-fache und 20-fache unserer Minimaldosis.

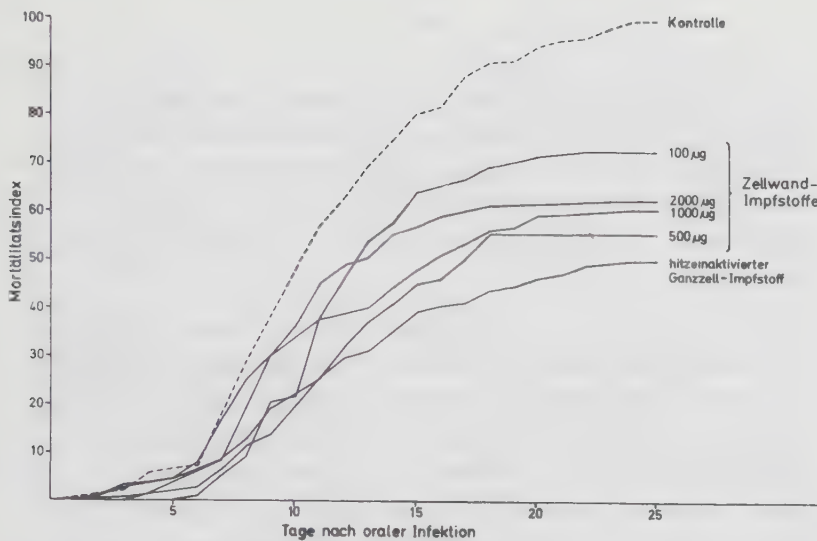


Abb. 5 Orale Impfung mit Zellwänden aus *S. typhi murium* in unterschiedlicher Dosierung.

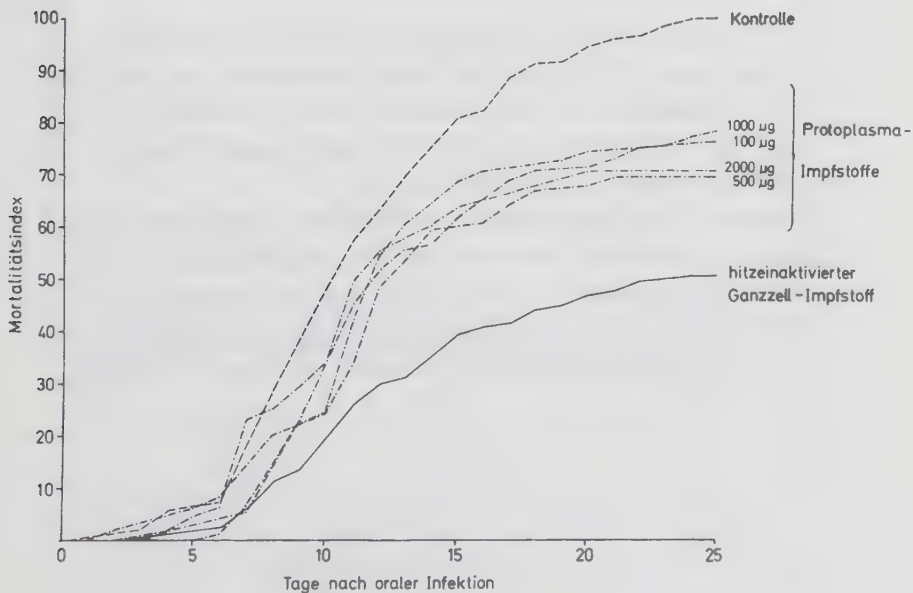


Abb. 6 Orale Impfung mit Protoplasma aus *S. typhi murium* in unterschiedlicher Dosierung.

In den Abbildungen 5 und 6 sind die Ergebnisse für die Zellwand- und Protoplasma-Impfstoffe wiederum an der Mortalitätssummenkurve dargestellt. Die Kurven für den Ganzzell-Impfstoff und die Kontrolltiere sind für beide Abbildungen dieselben. Sie sind in Relativprozent bezogen auf 100 %ige Mortalität der unbehandelten Kontrolltiere angegeben.

Man erkennt, daß beide Impfstoffe in den vier angegebenen Dosierungen die Mortalität gegenüber den Kontrolltieren zu senken vermögen. Die stärkste Absterberate zeigt sich zwischen dem 6. und 17. Tag und liegt für die Protoplasma-Impfstoffe insgesamt höher als für die Zellwand-Impfstoffe. Die Kurvenscharen für die beiden Impfstoffe zeigen somit in Dosierungen von 100-2000 μ g weitgehend dieselbe Dynamik und erreichen größenordnungsmäßig dieselben Endmortalitäten. Eine gewisse Ausnahme macht der Zellwand-Impfstoff in der Dosierung von 100 μ g, der eine schlechtere Wirksamkeit als die höher dosierten gleichen Impfstoffe zeigt.

Man ersieht aus Tab. 3, daß die Echtheiten der unterschiedlich dosierten Impfstoffe Werte von über 1 erreichen und somit ein statistisch signifikantes Ergebnis darstellen. Lediglich die Gruppe Protoplasma-Impfstoff 100 μ g ist wegen der geringen Anzahl der beteiligten Tiere statistisch nicht zu verwerten.

Das bedeutet mit anderen Worten, daß beide Impfstoffe im Belastungsversuch eine schützende Wirkung aufweisen, jedoch nicht in der Lage sind, die Wirksamkeit des Ganzzell-Impfstoffs zu erreichen. Auch nicht in einer Dosierung, die etwa die zwanzigfache Menge an Zellwand- und Protoplasma-Material enthält wie der Ganzzell-Impfstoff.

Impfstoff	Versuche	Immunisierte Tiere		Kontroll-Tiere		D _b	D _z	E	W
		n	+	n	+				
Ganzzellen 10 ⁹	3-11	486	110	475	214	22, 4	4, 6	2, 95	49, 8
Zellwände 100 µg	3, 4, 6, 11	146	57	130	69	14, 1	13, 7	1, 03	26, 6
Zellwände 500 µg	3, 4, 6, 11	146	43	130	69	23, 6	15, 8	1, 50	44, 4
Zellwände 1000 µg	3, 4, 7, 8, 9, 10, 11	386	96	392	160	15, 9	7, 7	2, 07	39, 0
Zellwände 2000 µg	5, 12	239	70	250	117	17, 5	10, 5	1, 67	37, 4
Protoplasma 100 µg	3, 4, 11	94	38	97	51	12, 1	15, 6	0, 78	23, 1
Protoplasma 800 µg	3, 4, 6, 11	151	56	130	69	16, 0	14, 0	1, 14	30, 1
Protoplasma 1000 µg	3, 4, 7, 8, 9, 10, 11	378	121	392	160	8, 8	6, 4	1, 38	21, 6
Protoplasma 2000 µg	5, 12	250	83	250	117	13, 6	9, 3	1, 46	29, 1

Tab. 3 Endmortalitäten und Wirksamkeiten von Mäusekollektiven, die oral mit Zellwänden bzw. Protoplasma aus *S. typhi* murium in unterschiedlicher Dosierung geimpft wurden.

5. Varianz der Wirksamkeiten

Die Darstellung der bisherigen Summenkurven erfolgte unter Zusammenfassung von Versuchen, die, wie schon erwähnt und in Abb. 1 dargestellt, mit sehr unterschiedlicher Infektionsstärke abgelaufen sind. Diese Art der Darstellung gibt indes nicht die erreichte Wirksamkeit wieder, die nach der Durchimpfung eines einzelnen Mäusekollektives für den jeweiligen Impfstoff ermittelt wurde.

In Abb. 7 sind die einzelnen Wirkungsindices aller von uns im Belastungsversuch getesteten Impfstoff-Gruppen und -dosierungen zusammengestellt. Folgendes ist dabei erwähnenswert:

- Von den dargestellten Einzelgruppen konnte nur in einem einzigen Fall keine Senkung der Endmortalität gegenüber den Kontrolltieren erreicht werden. Bei dieser Ausnahme (Protoplasma-Impfstoff 1000 μ g in Versuch 11) handelte es sich offensichtlich um eine Superinfektion, die noch nach dem 20. Tag zu einem Mortalitätsanstieg führte.
- Auffällig ist die starke Varianz der Wirksamkeiten der Zellwand- und Protoplasma-Impfstoffe in den verschiedenen Versuchen. Sie schwankt z. B. für Zellwände in der Dosierung von 500 μ g zwischen einem Wirkungsindex von 8,4 im 4. Versuch und 87,4 im 11. Versuch. Gegenüber der großen Schwankungsbreite der Zellwand- und Protoplasma-Fraktion fällt die relative Konstanz der Wirksamkeiten des Ganzzell-Impfstoffes auf. Hier beträgt der niedrigste Wert 39,4, der höchste 73,4 bei einer errechneten mittleren Wirksamkeit von 49,8.

Bei einem Vergleich der Wirksamkeiten in Abb. 7 mit den Endmortalitäten der Kontrollen in Abb. 1, die wir als Maß für die Infektionsstärke bezeichnet haben, erkennt man eine umgekehrt proportionale Korrelation zwischen Infektionsstärke und Wirksamkeit der Impfstoffe. Als typische Beispiele seien Versuch 4 und 11 aufgeführt.

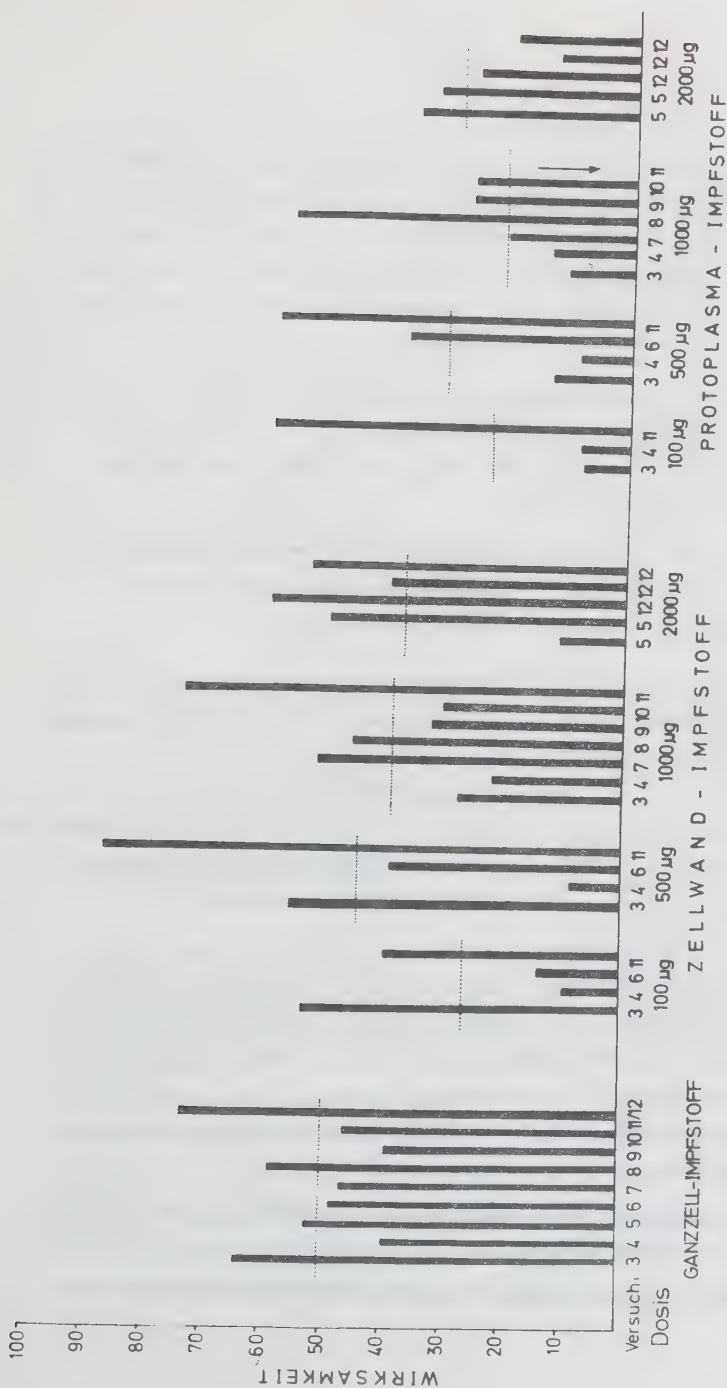


Abb. 7 Wirksamkeiten der Ganzzell-, Zellwand- und Protoplasmaimpfstoffe in den einzelnen Versuchen. Die gestrichelte Linie gibt die mittlere Wirksamkeit der verschiedenen Dosierungen an.

Der 4. Versuch, bei dem die Belastungsinfektion am stürmischsten abgelaufen war, zeigt in fast allen Impfstoffgruppen die niedrigste Wirksamkeit. Der Infektionsschutz wurde gewissermaßen von der ungewöhnlich starken Explosionsepidemie durchschlagen. Dies gilt am wenigsten für den Ganzzell-Impfstoff, der zwar in dieser Gruppe den niedrigsten Wert aufweist, aber mit einer Wirksamkeit von 39,4 noch als guter Impfstoff bezeichnet werden kann.

Für die Protoplasma- und Zellwand-Impfstoffe erhielten wir z. T. so geringe Werte, daß von einem Schutz nicht mehr gesprochen werden kann. Die Ergebnisse liegen teilweise noch innerhalb der Irrtumswahrscheinlichkeit.

Der Versuch 11 als das Beispiel einer milde verlaufenen Epidemie zeigt dagegen allgemein einen auffallend hohen Wirkungsgrad der an diesem Versuch beteiligten Impfstoff-Gruppen.

Daß diese reziproke Korrelation zwischen Infektionsstärke und Wirkungsquotient nicht nur an der Endmortalität verifiziert werden kann, zeigen die beiden aufgezeichneten Einzelversuche 12 (Abb. 8) und 4 (Abb. 9). Diese beiden Abbildungen weisen Absterbekurven von zwei typischen Versuchen in ihrem Gesamtverlauf auf. Die Charakteristika der unterschiedlichen Fulminanz dieser beiden Experimental-Epidemien wird beim Vergleich der Abbildungen 8 und 9 deutlich:

In dem einen Fall (Abb. 8), in dem die Endmortalität der Kontrolltiere nur 30 % erreicht, steigen die Kurven flach an und erreichen etwa um den 18. Tag ihre Endmortalitäten. Der Beginn des Absterbens wird durch die Immunisierung charakteristisch verzögert. Diese verlängerte Überlebenszeit durch Kontakt mit dem Impfstoff wird neben der gesenkten Endmortalität als zweites wichtiges Kriterium für den aktiv erworbenen Schutz gewertet.

Abb. 9 dagegen zeigt einen steilen Anstieg der Kurvenschar, wobei die Endmortalitäten bereits um den 14. Tag erreicht sind und allgemein keine große Senkung durch den Impfstoffkontakt erzielt wer-

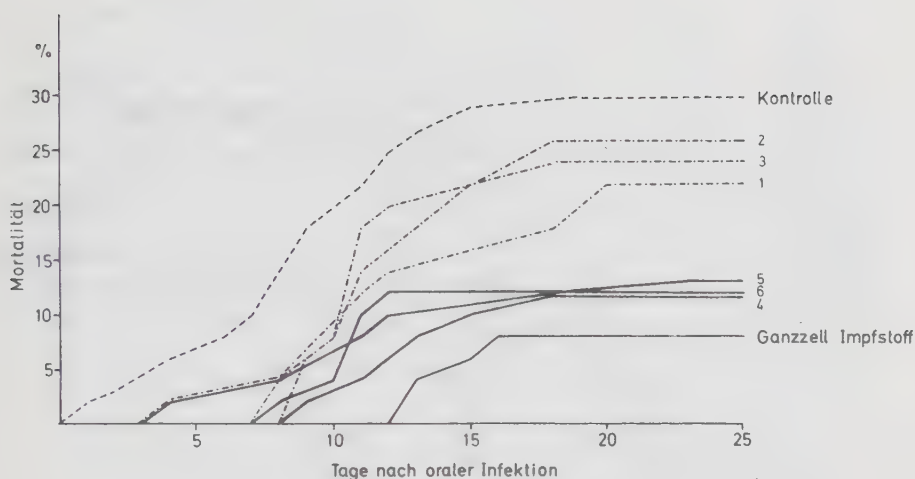


Abb. 8 Versuch 12 als Beispiel einer milde abgelaufenen Belastungsinfektion mit allgemein starker Senkung der Endmortalität und Verlängerung der Überlebenszeit gegenüber den Kontrollen

- 1 Protoplasma 2000 μ g (100⁰/3')
- 2 Protoplasma 2000 μ g (75⁰/15')
- 3 Protoplasma 2000 μ g (60⁰/30')
- 4 Zellwände 2000 μ g (100⁰/3')
- 5 Zellwände 2000 μ g (75⁰/15')
- 6 Zellwände 2000 μ g (60⁰/30')

den konnte. Auch die Überlebenszeit konnte maximal (im Falle des Ganzzell-Impfstoffes) nur um drei Tage gegenüber den Kontrollen verlängert werden. Im 12. Versuch dagegen betrug die Verlängerung 12 Tage.

Die tabellarische Zusammenfassung aller an den Versuchen beteiligten Tiere zeigt die Tab. 4. Hier sind die Impfstoffwirkungen von Ganzzellen, Zellwänden und Protoplasma unabhängig von der Inaktivierungstemperatur und Impfstoffdosis zusammengefaßt.

Die Wirksamkeiten sind in der letzten Spalte enthalten und zeigen

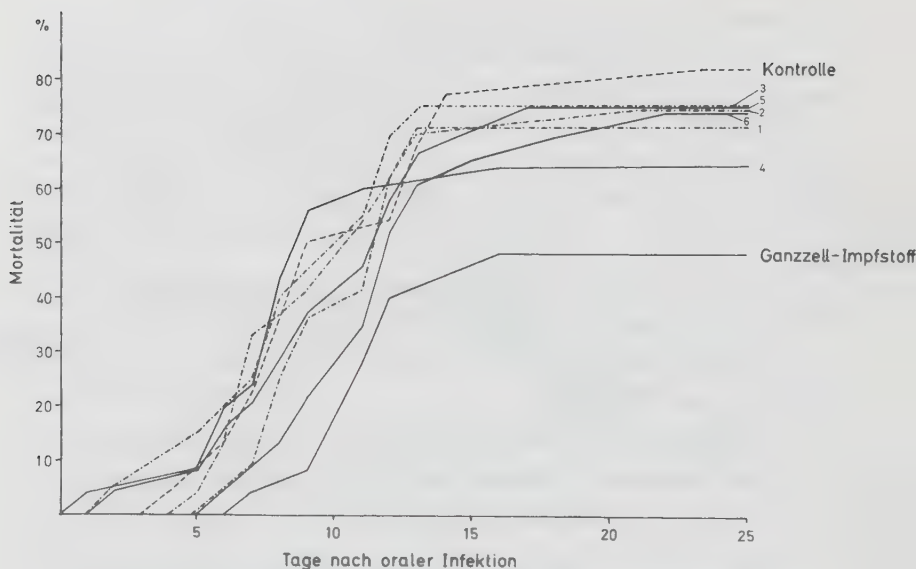


Abb. 9 Versuch 4 als Beispiel einer stürmisch abgelaufenen Belastungsinfektion ohne signifikante Impfstoff-Wirksamkeit

1	Protoplasma	1000 μ g	(60°/30')
2	Protoplasma	500 μ g	(60°/30')
3	Protoplasma	100 μ g	(60°/30')
4	Zellwände	1000 μ g	(60°/30')
5	Zellwände	500 μ g	(60°/30')
6	Zellwände	100 μ g	(60°/30')

eine Abnahme von Ganzzellen (49,8) über Zellwände (37,0) zu Protoplasma (25,2). Die Werte für die Echtheit sind entsprechend der Anzahl der Tiere in den einzelnen Impfstoffgruppen sehr hoch (für 1 % Irrtumswahrscheinlichkeit). Überzufällige Differenzen sind nicht nur gegenüber den Kontrolltieren, sondern auch gegenüber den Kollektiven der anderen Impfstoffgruppen vorhanden.

Impfstoff	Immunisierte Tiere			Kontroll-Tiere			D _b	D _z	E	W
	n	+	a%	n	+	b%				
Zellwände	917	266	29,0	902	415	46,0	17,0	4,9	3,47	37,0
Proto-plasma	873	298	34,1	869	397	45,6	11,5	4,4	2,61	25,2
Ganzzellen	486	110	22,6	475	214	45,0	22,4	7,8	2,87	49,8

Tabelle 4

Diskussion

Das Ergebnis eines experimentellen aktiven Schutzversuches hängt bei oraler Infektion mit *S. typhi murium* entscheidend von der Intensität der Belastungsinfektion ab. Wenn sie nämlich zu hoch gewählt wird, so kommen die protektiven Immunphänomene, wie z. B. unser 4. Versuch (Abb. 9) deutlich zeigt, nicht mehr zum Tragen.

Auf der anderen Seite ist bei einer zu geringen Belastungsinfektion, bei der z. B. nur 20 % der Kontrolltiere sterben (und entsprechend weniger von den geimpften), die Anzahl im statistisch verwertbaren Kollektiv sehr gering. Für den Erfolgsvergleich zwischen geimpften und nicht geimpften Individuen stehen nur 20 % des Gesamtkollektives zur Verfügung, obwohl sich die restlichen 80 %, für welche die Belastungsinfektion subletal war, ebenfalls mit dem Antigenreiz auseinandergesetzt haben.

In den vorgelegten Versuchen schwanken die Endmortalitäten der Kontrollen zwischen 23 % und 82 %. Ähnliche Schwankungsbreiten sind auch von anderen Autoren gesehen worden (14). Da wir jedoch keine Relation zwischen der Menge der eingebrachten Bakterien und der Infektionsstärke beobachteten, andererseits die Versuchstiere bezüglich Alter, Geschlecht, Stamm, Zucht, Gewicht und Haltung einheitlich waren, vermuten wir eine Virulenzabnahme des Infektionsstammes im Verlauf der Versuchsreihen. Dafür spricht auch die absteigende Tendenz in der Höhe der Säulen in Abb. 1, die die Endmortalitäten der Kontrolltiere wiedergeben.

Um die Wirkung von mechanischen und thermischen Einflüssen auf den Impfstoff abschätzen zu können, ist es erforderlich, sich zunächst über die in Frage kommenden schützenden Komponenten der Bakterien klarzuwerden.

SALTON (37) teilt die verschiedenen Antigene der gramnegativen Bakte-

rienzellwand in drei Gruppen ein:

Oberflächen-Antigen

Protektives Antigen

Endotoxin

Von diesen drei Gruppen ist lediglich das O-Antigen, auf dessen agglutinierender Fähigkeit u. a. das Kauffmann-White-Schema basiert, inzwischen chemisch genau definiert (21, 41). Es sind auf der Oberfläche der Zellwand typisch angeordnete, hitzestabile Polysaccharide.

Dagegen ist eine Zuordnung des protektiven Antigens und des Endotoxins zu einer exakt aufgeklärten chemischen Struktur noch nicht gelungen.

Nach GÖING und KAISER (12) ist das Endotoxin ein Makromolekül, das sich aus Lipoid A, Lipoid B, einem Lipopolysaccharid und einer Proteinkomponente zusammensetzt. Durch verschiedene chemische Extraktionsverfahren werden unterschiedliche Teilkomponenten des Endotoxins isoliert. Diese sind zwar in ihrer chemischen Struktur und antigenen Eigenschaft weitgehend bekannt, keine konnte jedoch im isolierten Zustand für die durch natives Endotoxin hervorgerufene Vielzahl an Immunphänomenen verantwortlich gemacht werden. Toxizität und Schutzwirkung beispielsweise sind unabhängig voneinander extrahierbar, also auf verschiedenen Makromolekül-Anteilen verankert.

Das protektive Antigen beschreiben JENKIN und ROWLEY (16) als einen Teil des hitzelabilen somatischen Antigens 5 nach Kauffmann-White. Da sie mit hitzeinaktivierten *S. typhi murium*-Bakterien bei i. p. -Immunisierung schlechteren Schutz sahen als durch acetininaktivierte, glaubten sie auf dieses hitzelabile O-Antigen schließen zu können. Es soll zu Opsoninen führen, die wesentlich für die allgemeine Schutzwirkung sind (15).

Von anderen Untersuchern (17) wird ein hitzelabiles Phospholipoprotein (Toxin L) für das schützende Antigen gehalten.

Dieser Auffassung, daß die Schutzwirkung von einer umschriebenen che-

mischen Verbindung ausgeht, widerspricht COLLINS (4, 5). Er meint, daß es sich nicht lohne, durch immer subtilere Extraktionsverfahren dem protektiven Antigen eine exakt definierte chemische Substanz zuzuordnen zu wollen. Nach seiner Auffassung vermittelt das komplexe Ganzzell-Antigen den besten Schutz, und zwar lebende Bakterien einen besseren als Totimpfstoffe.

Auch wir neigen aufgrund der zu diskutierenden Unterschiede des Temperatureinflusses auf die verschiedenen Impfstoffe zu der Ansicht COLLINS. Wir verstehen unter schützendem Antigen (= Immunogen) die Summe der antigenen Eigenschaften, die zu einer Erniedrigung von Morbidität und Mortalität führen.

Die Frage, ob auch von gereinigtem Protoplasma im Belastungsversuch eine Schutzwirkung ausgeht, wird nicht einheitlich beurteilt:

MILLECK (24) erzielte z. B. mit Protoplasma-Impfstoff aus *B. pertussis* (im Frier-Tau-Verfahren hergestellt) sehr guten Schutz. Die Ergebnisse, die er mit Zellwandimpfstoff erzielte, waren weniger gut und lagen etwa in der Größenordnung wie diejenigen mit Ganzzellen. Bei trypsinbehandelten Zellwänden sah er nur noch sehr geringe Immunogenität. Dagegen zeigt die Arbeitsgruppe um RIBI (9, 34, 26, 38, 1), daß für sehr verschiedene Infektionserreger (*Br. abortus*, *S. enteritidis*, *B. pertussis*, *Hist. capsulatum*, *Cox. burneti*) der überwiegende Anteil der schützenden Faktoren in den Zellwänden lokalisiert war. Sie konnten nur geringen Schutz mit Protoplasma induzieren. Dieser auch in unserer Arbeit nachzuweisende geringe Anteil an Immunogen im Protoplasma könnte durch das occulte Endotoxin repräsentiert sein, das im Protoplasma nachgewiesen wurde (36).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen die Schutzwirkungen von Ganzzellen, Zellwänden und Protoplasma von *S. typhi murium*-Bakterien, bei ausschließlich oraler Gabe von Antigen und Belastungsinfektion.

Von diesen Impfstoffen zeigten die hitzeinaktivierten Ganzzellen den

besten Schutz. Sie konnten die Mortalität nach Belastung auf etwa die Hälfte senken. Dies entspricht dem Wert, der an einem großen Material für die orale Immunisierung mit *S. typhi murium*-Ganzzellen gefunden wurde (30). Auch die Überlebenszeit wurde charakteristischerweise verlängert, im Mittel um 5 Tage. Als ein weiteres Indiz für die gute Schutzwirkung sahen wir relativ konstante Wirksamkeiten bei unterschiedlicher Fulminanz der Belastungsinfektion.

Diese Befunde widersprechen der jüngst geäußerten Ansicht (6), Totimpfstoffe hätten - wenn überhaupt - nur sehr geringe immunisierende Wirkung, da sie anscheinend eine in vivo Vermehrung des Infektionsstammes nicht zu hemmen vermögen.

Ein signifikanter Schutz wurde auch durch den Zellwand-Impfstoff erreicht. Bei einer mittleren Wirksamkeit von 37,0 liegt er aber deutlich unter demjenigen, den wir bei den hitzeabgetöteten Ganzzellen gesehen haben. Die Verzögerung des Absterbezeitpunkts ist nicht so eindeutig wie bei dem Ganzzell-Impfstoff. Sie beträgt im Mittel 2 Tage, ist aber ebenso wie die Mortalitätssenkung stark von der Infektionsstärke des jeweiligen Versuches abhängig. So sehen wir Extremwerte in den verschiedenen Versuchen: Den höchsten überhaupt erreichten Wirkungsindex von 87,4 und Werte unter 10, die noch innerhalb der Zufallsdifferenz liegen.

Damit unterscheiden sich unsere Ergebnisse mit gereinigten Zellwänden von denen, die für die parenterale Anwendung beschrieben sind. RIBI et al. (24) fanden bei der i.v.-Immunisierung mit Zellwänden aus *S. enteritidis* einen siebenfach höheren Schutz als mit gleichen Mengen Ganzzellen. Dies ist mehr als nach der 1/3 zu 2/3 Gewichtsverteilung von Zellwänden zu Protoplasma erwartet werden könnte und spricht für einen zusätzlichen schutzsteigernden Effekt durch das Aufsprengverfahren. RIBI sieht ihn in der Freilegung der Innenseite der Zellwände, die damit eine größere Oberfläche und bessere Kontaktmöglichkeit mit dem RES haben als die intakten Bakterien.

Für unsere eigenen Versuche könnte diese Hypothese folgendermaßen aus-

gelegt werden: Bei der oralen Applikation von Zellwänden bietet deren vergrößerte Oberfläche auch den Verdauungsenzymen des Magen-Darm-Traktes eine größere Angriffsfläche, so daß die Destruktion der Zellwandstruktur eher möglich ist als bei den Ganzzellen.

Eine andere Deutungsmöglichkeit für die schlechtere Wirksamkeit des Zellwand-Impfstoffes gegenüber dem Ganzzell-Impfstoff könnte in der unterschiedlichen Beeinflußbarkeit der beiden Impfstoffe durch die Hitzeeinwirkung begründet sein. KORDES (20) hat gezeigt, daß die Hitzeinaktivierung der *S. typhi* murium-Bakterien bei 100°/3' einen besseren Impfstoff ergibt als die bei 60°/70'. Bei den Impfstoffen aus der RIBI-Presse dagegen sahen wir keinen Unterschied bei den beiden geprüften Temperaturen und Zeiten.

Der Grund für das differente Verhalten von Ganzzellen und Zellwänden könnte darin zu suchen sein, daß durch die Aufsprengungs- und Reinigungsprozedur der hitzelabile Anteil des Immunogens so verändert wurde, daß er durch Temperatureinfluß leichter ausgeschaltet wird als im unversehrten Bakterium. Von den diskutierten Antigengruppen würde dies z. B. für das somatische Antigen 5, das Toxin L und die Proteinkomponente des Endotoxins gelten, während der hitzestabile Anteil des Immunogens den in unseren Versuchen gezeigten restlichen Schutz vermitteln würde.

Zu diskutieren ist weiterhin die Tatsache, daß eine Erhöhung der Impfstoffdosis von Zellwänden und Protoplasma keinen erhöhten Schutz im Belastungsversuch bewirkt hat. In einem Dosisbereich, der etwa einer Ganzzell-Menge von 10^9 bis 2×10^{10} Keimen äquivalent ist, haben wir gleiche Schutzwirkungen erhalten. Dies stimmt mit Befunden überein, die am gleichen Infektionsmodell mit hitzeinaktivierten Ganzzellen gemacht wurden (18). Danach waren Dosierungen von 10^{10} und 10^{11} Keimen nicht wirksamer als die Dosierung von 10^9 Keimen. Es kann deshalb angenommen werden, daß unsere geprüften Impfstoffdosierungen von 1000 und 2000 µg bereits im Überdosisbereich liegen.

Zusammenfassung

Hitzeinaktivierte Ganzzellen sowie in der RIBI-Pressen hergestellte Zellwand- und Protoplasma-Impfstoffe aus *S. typhi murium* wurden im Mäuseschutzversuch auf ihre Immunogenität untersucht. Der Ganzzellimpfstoff (Titer 10^9) zeigte den besten Schutz und senkte die Mortalität gegenüber den Kontrollen um 50 % (Wirkungsindex 50). Die Überlebenszeit wurde charakteristisch verlängert.

Der Zellwand-Impfstoff erzielte in einer Dosierung von 1 - 20 mg (etwa 10^9 bis 2×10^{10} Ganzzellen äquivalent) einen Wirkungsindex von 37. In derselben Dosierung erzielte der Protoplasma-Impfstoff einen Wirkungsindex von 25. Unterschiede in der Schutzwirkung bei verschiedenen Inaktivierungstemperaturen und innerhalb der angegebenen Dosismengen wurden nicht gesehen.

Diese Ergebnisse werden diskutiert und mit der Literatur verglichen.

Literatur

- 1 ANACKER RL, DB LACKMAN, EG PICKENS, E RIBI
 Antigenic and skin-reactive properties of fractions
 from *Coxiella burneti*
 J. Immunol. 89, 145 (1962)
- 2 BESREDKA A
 Die lokale Immunisierung (Deutsche Übersetzung von
 G. Blumenthal)
 Joh. Ambrosius Barth Verl., Leipzig (1926)
- 3 BLANDEN RV, GB MACKANESS, FM COLLINS
 Mechanisms of acquired resistance in mouse typhoid
 J. Exp. Med. 124, 585 (1966)
- 4 COLLINS FM
 Recall of Immunity in mice vaccinated with *Salmonella enteritidis* or *Salmonella typhi* murium
 J. Bact. 95, 2014 (1968)
- 5 COLLINS FM, M MILNE
 Heat-Labile antigens of *Salmonella enteritidis*
 II Mouse protection studies
 J. Bact. 92, 549 (1966)
- 6 COOPER GN, KJ FAHEY
 Oral immunization in experimental salmonellosis
 III Behavior of virulent and temperature-sensitive
 mutant strains in the intestinal tissues of rats
 Inf. and Imm. 2, 192 (1970)
- 7 CVJETANOVIC B, K UEMURA
 The present status of field and laboratory studies
 of typhoid and paratyphoid vaccines
 Bull. Wld. Hlth. Org. 32, 29 (1965)
- 8 EDWARDS WM, RJ CRONE, JF HARRIS
 Outbreak of typhoid fever in previously immunized
 persons traced to a common carrier
 New Engl. J. Med. 267, 742 (1962)
- 9 FOSTER JW, E RIBI
 Immunological role of *Brucella abortus* cell walls
 J. Bact. 84, 258 (1962)

- 10 FRENCH CS, HW MILNER
Methods in enzymology Hrsg.: S.P. Colowicks und
N.O. Kaplan
Acad. Press, New York S. 64-67
- 11 FRETER R
Detection of coproantibody and its formations after
parenteral and oral immunization of human volunteers
J. Inf. Dis. 111, 37 (1962)
- 12 GÖING H, P KAISER
Aufbau und Wirkungsweise bakterieller Endotoxine
Erg. Mikrobiol., Immfrsch. u. exp. Th. 39, 243 (1970)
- 13 HASKINS WT, M LANDY, KC MILNER, E RIBI
Biological properties of parent endotoxins and lipid
fractions, with a kinetic study of acid-hydrolyzed
endotoxin
J. Exp. Med. 114, 665 (1961)
- 14 JANDL G
Experimentelle Untersuchungen zum Mechanismus
der oralen Typhus-Immunisierung
Zschr. f. Hyg. 151, 34 (1965)
- 15 JENKIN CR, D ROWLEY
Basis for immunity to typhoid in mice and the
question of "cellular immunity"
Bact. Rev. 27, 391 (1963)
- 16 Partial purification of the "protective" antigen
of Salmonelle typhi murium and its distribution
amongst various strains of bacteria
Austr. J. Exp. Med. Sci. 43, 65 (1965)
- 17 KAWAKAMI M, N OSAWA, S MITSUHASHI
Experimental salmonellosis
VII. Mitteilung
J. Bact. 92, 1585 (1966)
- 18 KOHLSCHMIDT K
Gibt es nach hochdosierter, oraler Impfung mit
Salmonella typhi murium-Antigen eine Immun-
paralyse?
Inaug. Diss., Berlin (1970)

- 19 KOLLER S
Neue graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer
Zahlen
D. Steinkopff Verl., Darmstadt (4. Aufl. 1969)
- 20 KORDES B
Orale Immunisierung von Mäusen mit Impfstoffen aus
physikalisch inaktivierten *S. typhi murium*-Bakterien
Inaug. Diss., Berlin (1969)
- 21 LÜDERITZ O, O WESTPHAL
Die Bedeutung von Mutanten bei Enterobacteriaceen
für die chemische Erforschung ihrer Zellwand-
Polysaccharide
Ang. Chem. 78, 172 (1966)
- 22 LÜDERITZ O
Neuere Ergebnisse zur Biochemie der Zellwand-
Lipopolysaccharide von Salmonella-Bakterien
Ang. Chem. 18, 708 (1970)
- 23 METCHNIKOFF E, A BESREDKA
Recherche sur la fièvre typhoïde expérimentale
Ann. Inst. Past. 25, 192 (1911)
- 24 MILLECK J
Die schützende Wirkung von Zellwänden und Cytoplasma
aus *B. pertussis*
Zschr. Immunforsch. 133, 126 (1967)
- 25 MILLER WS, DL CLARK, OC DIERKHISING
A laboratory comparison of United States and
British Army typhoid and paratyphoid vaccines
Amer. J. Trop. Med. 31, 535 (1951)
- 26 MUNOZ J, E RIBI, CL LARSON
Antigens of *Bordetella pertussis*
I Activities of cell walls and protoplasm
J. Immunol. 83, 496 (1959)
- 27 NETER E
Endotoxins and the immune response
Curr. Top. Microbiol. Immun. 47, 82 (1969)

- 28 RAETTIG H
Die Seuchenkurve. Methoden der Darstellung und Probleme der Ausdeutung
Arch. f. Hyg. 144, 159 (1960)
- 29 Die lokale Immunisierung mit inaktiviertem Antigen gegen bakterielle Darminfektionen (Typhus, Paratyphus, Cholera, Ruhr)
Zbl. f. Bakt. I. Ref. 183, 1 (1962)
- 30 RAETTIG H
Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen
1. Mitt.: Der Grundversuch zur Schutzimpfung der Maus gegen eine Enteritis-Infektion
Zbl. f. Bakt. I. Orig. 193, 398 (1964)
2. Mitt.: Experimente zur unspezifischen Schutzimpfung bei der Enteritis-Infektion der Maus
Zbl. f. Bakt. I. Orig. 197, 368 (1965)
3. Mitt.: Dosierung und Impfrhythmus bei der spezifischen Impfung der Maus gegen Salmonellen-Enteritis
Zbl. f. Bakt. I. Orig. 203, 478 (1967)
- 31 Neues zur Wirkungsweise der oralen Immunisierung
Zbl. f. Bakt. I. Ref. 201, 291 (1966)
- 32 Neue Modellversuche zur Infektabwehr des Darmes
Zbl. f. Bakt. I. Orig. 198, 206 (1965)
- 33 RAUSS K, J KETYI
Serum- and coproantibodies in mice, immunized perorally with *Shigella flexneri*
Zschr. Immunforsch. 127, 37 (1964)
- 34 RIBI E, KC MILNER, TD PERRINE
Endotoxic and antigenic fraction from the cell wall of *S. enteritidis*. Methods for separation and some biologic activities
J. Immun. 82, 75 (1959)
- 35 RIBI E, KC MILNER
Disruption of bacteria and preparation of cell walls
Methods in immunology and immunochemistry. Ed. by C.A. Williams and M.W. Chase, Acad. Press.
Vol. I B 13 (1967)

- 36 RUDBACH JA, KC MILNER, E RIBI
 Occult endotoxin in bacterial protoplasm
 J. Bact. 99, 51 (1969)
- 37 SALTON MRJ
 The bacterial cell wall
 Elsevier PublishingComp., Amsterdam (1964)
- 38 SALVIN SB, E RIBI
 Antigens from the yeast phase of Histoplasma capsulatum.
 Immunologic properties of protoplasm versus cell walls
 Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 90, 287 (1955)
- 39 TORIKATA R, M IMAIZUMI
 Zum Unterschiede zwischen der Injektions- und der
 oralen Immunisierung
 Zschr. Immunforsch. 94, 342 (1938)
- 40 WESTPHAL O
 Die Struktur der Antigene und das Wesen der
 immunologischen Spezifität
 Naturwiss. 46, 50 (1959)
- 41 WESTPHAL O, O LÜDERITZ
 Chemie bakterieller O-Antigene
 Pathol. et Microbiol. 24, 870 (1961)

Herrn Prof. Dr. Raettig danke ich für die Themenstellung und Unterstützung bei der Auswahl der Versuchsansätze.

Herr Dr. Brehmer beriet mich bei der Impfstoff-Herstellung und stellte mir die RIBI-Presse zur Verfügung.

Frau Ganze half mir bei der technischen Durchführung der Mäuse-Impfung.

Lebenslauf

Am 16.10.1942 wurde ich, Hans Joachim Kolb, in Tübingen als sechstes Kind des Dr. med. Georg Kolb und Frau Frieda, geb. Hunsinger geboren.

Von 1948 bis 1953 besuchte ich die ev. Volksschule in Walddorf Kreis Tübingen. Dort war mein Vater seit 1934 als praktischer Arzt tätig. Ab 1953 besuchte ich als Fahrschüler das math.-nat. Johannes-Kepler-Gymnasium in Reutlingen und erlangte 1962 die Hochschulreife. Anschließend erfolgte die Einberufung zur Bundeswehr mit der Entlassung im Jahre 1964 als Leutnant d. R.

Im Sommersemester 1964 begann ich das Medizinstudium an der Freien Universität Berlin, wo ich am 13. August 1970 die ärztliche Prüfung ablegte.

Seit November 1970 bin ich mit Renate, geb. Krug verheiratet.

Praktische medizinische Tätigkeit:

1. Krankenpflegedienst in Tübingen und Montreal

2. Famulaturen:

- I. Inn. Abteilung des Städt. Krkh. Moabit, Berlin,
- II. Inn. Abteilung (Infektiologie) des Rud.-Virchow-Krkh., Berlin
- Chirurg. Abteilung des Rud.-Virchow-Krkh., Berlin
- Kaiserin-Auguste-Viktoria-Haus (Univ. Kinderklinik), Berlin

3. Hospitant und Medizinalassistent im Robert Koch-Institut,
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung,
Inn. Abteilung des Städt. Behring-Krkh., Berlin

